文章编号:1000-5404(2007)17-1729-03

技术方法

卡莫司汀诱导大鼠皮质发育障碍模型的研究

何选丽,晏 勇,马勋泰,黄 华,文 明,刘祥琴 (重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨用卡莫司汀诱导建立大鼠皮质发育障碍的动物模型。**方法** 给孕17 d母鼠腹腔注射卡莫司汀。观察仔鼠生长发育情况及日常行为,用水迷宫实验测试其学习记忆能力、红藻氨酸诱导癫痫发作并比较其痫性发作阈值,最后进行组织病理学检查。**结果** 模型组仔鼠出现生长发育缓慢、日常活动能力差、学习能力降低,痫性发作阈值降低($P<0.05$);病理改变包括大脑皮质厚度变薄、层状结构紊乱、神经细胞缺失、神经细胞发育不良,皮质及海马神经元异位等异常。**结论** 孕期母鼠腹腔注射卡莫司汀15 mg/kg可成功建立仔鼠皮质发育障碍模型。

随着近年来影像技术的飞速发展,已发现大脑皮质发育障碍(disorders of cortical development, DCDs)是儿童和成人难治性癫痫(intractable epilepsy, IE)和智能发育障碍的主要病因之一[1]。IE严重危害人类身心健康,是神经科临床面临的一个非常棘手的难题。近年来许多研究者对DCDs的病因和形成机制进行了大量研究,但由于获取DCDs患者脑组织病理标本有一定难度,又不能动态和全方位研究DCDs的病因、行为学和各年龄段的组织病理变化等,因此制作各种因素的DCDs模型就成为研究的重要部分。课题组在成功制作冰冻损伤及射线模型的基础上,用孕鼠腹腔注射卡莫司汀(carmustine)方法制作子代鼠DCDs模型,观察其行为学与病理改变,探索其致DCDs的类型和可靠性。

1 材料与方法

1.1 材料与动物分组

1.1.1 仪器及试剂 大鼠Morris水迷宫(重庆医学科学院药研所)、卡莫司汀(天津人民制药厂)、红藻氨酸(Sigma公司)。

1.1.2 实验动物及其分组 SD孕鼠6只(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量290~320 g,分为模型组和正常对照组,每组各3只。模型组3只孕鼠共产仔鼠30只、存活为25只,对照组3只孕鼠产仔鼠32只,全部存活。选取各组仔鼠10只于出生后第21天(postnatal 21 day,P21)作水迷宫实验,P84时作红藻氨酸诱发实验,选取各组仔鼠6只于P21、6只于P84取脑组织作病理检查。

1.2 方法

1.2.1 模型的制作方法 按照Benardete等[2]介绍的方法加以改进,给孕17 d SD大鼠腹腔注射卡莫司汀(15 mg/kg),用生理盐水稀释(4 mg/ml)。对照组腹腔注射等量生理盐水。处理后将孕鼠放回笼中正常喂养待其分娩。

1.2.2 子代大鼠生长发育和一般行为学观察 于出生当天(P0)、7(P7)、14(P14)、21(P21)、56(P56)及84 d(P84)各时间点测量各组仔鼠体质量,将纳入实验并存活至P84的仔鼠用作统计处理,2组各16只。每天8AM至6PM观察仔鼠有无异常行为、智能障碍、自发癫痫发作等。

1.2.3 Morris水迷宫行为的测定 定位航行试验用于测量仔鼠对水迷宫学习和记忆能力。实验历时5 d,每天分为上、下午2段,每段训练4次,每次训练大鼠分别从4个不同的入水点入水,观察并记录大鼠寻找且爬上平台所需时间(逃避潜伏期,escape latency)及游泳速度。如果大鼠在120 s内未找到平台,需将其引至平台,潜伏期则记为120 s,每次训练间隔60 s。空间搜索试验用于测量大鼠学会寻找平台后对平台空间位置记忆的能力,即在第5天撤除平台,然后任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中,测其在120 s内跨过原平台所在位置的次数。

1.2.4 红藻氨酸诱发实验 按Gupta等[3]介绍的方法对P84仔鼠腹腔注射红藻氨酸15 mg/kg,观察癫痫发作情况,发作程度按Racine法分级。记录注射红藻氨酸至单侧前肢阵挛(Ⅲ级发作)的时间作为潜伏期以及阵挛发作持续的时间。

1.2.5 病理标本制备 打开胸腔暴露心脏,先用生理盐水(100~200 ml)经左心室灌注,再用4%多聚甲醛灌注固定直至肝脏变白、四肢、尾巴变硬,取出大脑组织称重,4%多聚甲醛再次固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。冠状面取含海马结构5 μm厚的脑切片,每例共取10片。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 子代鼠生长发育情况

模型组仔鼠出生时体质量较对照组下降,一般状况差,生长发育缓慢,并随鼠龄的增长两组间差别越显著。出生时体质量低于5 g的仔鼠在出生后1~2周死亡,模型组死亡5只,模型组、对照组存活率分别为83.3%、100%。2组仔鼠整个生长情况(表1)。

基金项目:国家自然科学基金(30570636)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570636)
作者简介:何选丽(1976-),女,重庆市梁平县人,硕士研究生,医师,主要从事癫痫和难治性癫痫方面的研究。电话:(023)89012916
通讯作者:晏 勇,电话:13983989050,E-mail:yyanpro@21cn.com
收稿日期:2006-09-07;修回日期:2006-11-05

2.2 一般行为学观察

模型组仔鼠活动量减少，轻度嗜睡、并有反应迟钝、灵活性降低等表现，但实验过程中未观察到自发性癫痫发作。

2.3 水迷宫实验

模型组仔鼠在水中游泳速度减慢，动作协调性差、平衡能力降低，学习记忆能力减退，水中逃避潜伏期明显延长。随着学习记忆的反复强化，寻找平台能力逐渐增强，和对照组相比差异逐渐缩小($P<0.05$)(表2)。第5天撤除平台后模型组仔鼠跨过原平台所在位置平均为3次，对照组为7次，2组比较有显著性差异($P<0.05$)。

表1 模型组和对照组仔鼠各时间点体质量比较(g, $n=16$, $\bar{x}\pm s$)

组别	P0	P7	P14	P21	P56d	P84
对照组	6.91±0.30	14.37±1.90	30.2±1.79	43.4±3.91	126.0±8.06	210.5±16.14
模型组	5.75±0.50[a]	11.75±2.87[a]	19.33±4.93[a]	26.67±8.96[a]	93.6±2.97[a]	142.0±12.59[a]

a: $P<0.05$，与对照组比较

表2 模型组和对照组仔鼠平均逃避潜伏期比较(s, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第1天	第2天	第3天	第4天
对照组	36.39±10.23	28.70±7.16	17.19±5.76	13.41±4.52
模型组	97.64±25.48[a]	71.57±23.46[a]	53.78±26.80[a]	48.56±19.33[a]

a: $P<0.05$，与对照组比较

2.4 红藻氨酸诱发实验

模型组仔鼠癫痫发作表现为Ⅲ~Ⅳ级2只，Ⅴ级8只；对照组Ⅲ~Ⅳ级6只，Ⅴ级4只。模型组仔鼠与对照组相比痫性发作的潜伏期缩短、阈值降低，癫痫持续状态时间延长($P<0.05$)(表3)。

表3 模型组和对照组仔鼠癫痫易感性研究的比较(min, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	癫痫发作潜伏期	癫痫发作持续时间
对照组	10	81.60±25.77	192.5±27.30
模型组	10	36.90±16.36[a]	247.5±23.46[a]

a: $P<0.05$，与对照组比较

2.5 脑标本质量比较

模型组仔鼠与对照组相比脑组织质量减轻、体积缩小，随着鼠龄的增长差别越明显($P<0.05$)(表4)。

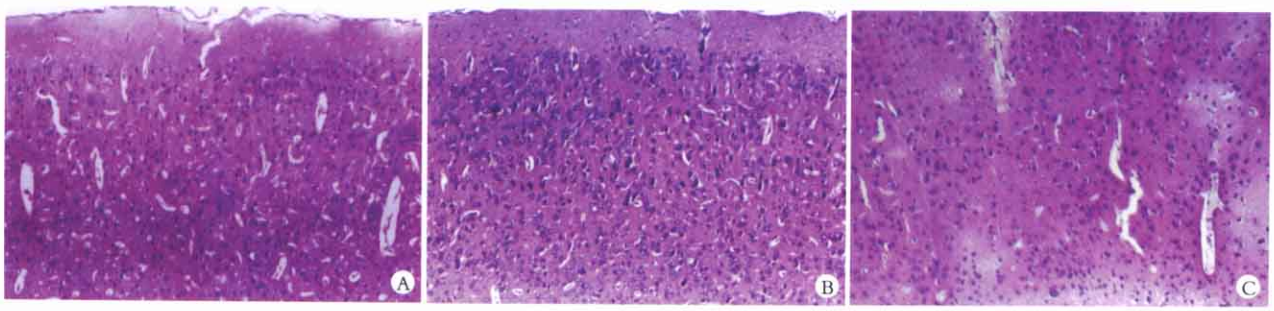
表4 模型组和对照组仔鼠各时间点脑质量比较(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	P21	P84
对照组	6	1.26±0.25	2.86±0.32
模型组	6	0.85±0.09[a]	1.47±0.21[a]

a: $P<0.05$，与对照组比较

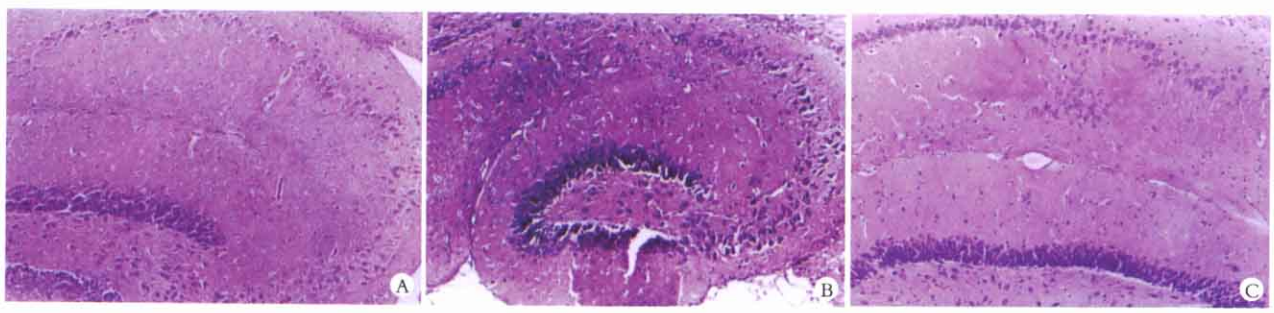
2.6 脑组织病理检查

对照组仔鼠大脑皮质层状结构清楚，神经元细胞排列有序(图1A)，模型组大脑皮质厚度下降，与对照组相比P21和P84时分别下降约10%、50%，且层状结构消失，神经元细胞排列紊乱呈成团状异位(图1B)，P84时出现神经元细胞缺失，细胞结构异常，发育不良(图1C)。对照组海马各区线型结构清楚，无异位细胞出现(图2A)，模型组海马CA1~CA2区线型结构中断模糊，异位神经元呈族状堆积，扰乱锥体细胞层(图2B)，P84时CA1区仍可见海马神经元呈结节状异位(图2C)。



A：对照组(第21天)；B：模型组(第21天)；C：对照组(第84天)

图1 仔鼠大脑皮质病理学变化 (HE×100)



A：对照组(第21天)；B：模型组(第21天)；C：模型组(第84天)

图2 仔鼠海马病理学变化 (HE×100)

3　讨论

大脑发育是十分复杂而又严格有序的过程。在大脑的整个发育期间内如受到内、外环境中有害因素如药物、射线、毒素、感染、外伤等因素的损伤，会直接干扰大脑发育各时期主要基因的有序、正确表达，从而影响神经元的正常增殖、分化、移行和组织构建等，导致神经元移行障碍（如各种神经元异位）或增殖分化异常（小头畸形，多微脑回、无脑回、巨脑回畸形等），形成 DCDs[4]。DCDs 包括局灶性皮质发育不良，脑周或皮质下结节状灰质异位，双皮质综合征，多微脑回、弥漫性巨脑回、无脑回畸形，脑裂畸形等类型。DCDs 是癫痫主要病因之一，且多为难治性癫痫。

妊娠 15～17 d 是胚胎鼠神经元移行的关键时期，极易受到外界有害因素的干扰。卡莫司汀又名 1，3-二氯乙烯-亚硝基脲（1-3-bis-chloroethyl-nitrosourea，BCNU），为抗肿瘤亚硝脲类 DNA 烷化剂，具有致畸作用[5]。本研究于孕 17 d SD 大鼠腹腔注射卡莫司汀 15 mg/kg，其子代鼠生后出现发育迟缓，体重及脑组织重量均较对照组显著下降，精神发育不全和智能障碍，其癫痫发作的易感性显著增加；病理检查显示大脑皮质变薄，层状结构紊乱，局灶性神经元发育不良、丢失，特征性表现为皮质、海马（尤其 CA1 区）神经元成团状异位等异常，与 Benardete 等[2]的结果一致。因此，本模型成功模拟了人类 DCDs 中弥散性皮质发育不良和海马神经元结节状异位等畸形类型。

模型组没有观察到自发性癫痫发作，这与国外药物和射线损伤模型观察结果一致。国外已有研究显示 DCDs 病灶区脑组织因兴奋－抑制机制失衡具有高兴奋性，而易诱发癫痫。国外学者通常运用红藻氨酸、匹罗卡品、热水浴等诱发实验检测其癫痫易感性，我们采用简单的腹腔注射红藻氨酸诱发实验显示模型组比对照组癫痫发作阈值降低、诱发的癫痫发作持续时间延长，说明模型组具有更低的癫痫发作阈值而容易发生癫痫。

在制作 BCNU 模型中，国外学者一般采用孕 15 d 大鼠以 20 mg/kg 剂量进行腹腔注射[2]。但是我们在预实验中发现此方法导致仔鼠死亡率极高，因此我们改用孕 17 d 孕鼠以 15 mg/kg 剂量进行腹腔注射，仔鼠的存活率相对较高，行为学、学习记忆、病理学改变均很典型，红藻氨酸易诱发癫痫发作。本模型是研究皮质发育障碍成因及致痫机制的可靠动物模型，且药品价廉容易购买、制作方法简便易行，值得推广应用。

关键词：皮质发育障碍；卡莫司汀；动物模型；癫痫

中图法分类号：R-332；R742.8　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Sisodiya S M. Surgery for focal cortical dysplasia[J]. Brain, 2004, 127(Pt 11): 2383－2384.

[2] Benardete E A, Kriegstein A R. Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in an animal model of dysplastic cortex[J]. Epilepsia, 2002, 43(9): 970－982.

[3] Gupta R C, Dettbarn W D. Prevention of kainic acid seizures-induced changes in levels of nitric oxide and high-energy phosphates by 7-nitroindazole in rat brain regions[J]. Brain Res, 2003, 981(1－2): 184－192.

[4] Guerrini R, Marini C. Genetic malformations of cortical development[J]. Exp Brain Res, 2006, 173(2): 322－333.

[5] Ueda-Kawamitsu H, Lawson T A, Gwilt P R. *In vitro* pharmacokinetics and pharmacodynamics of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU)[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(7): 1209－1218.

（编辑　汪勤俭）

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的适用性，每篇文章或资料应标识 1 个文献标识码。一般设置以下 5 种标准：

A：理论与应用研究学术论文（包括综述报告）

B：实用性技术成果报告（科技）、理论学习与社会实践总结（社科）

C：业务指导与技术管理性文章（包括领导讲话、特约评论等）

D：一般动态性信息（通讯、报道、会议活动、专访等）

E：文件、资料（包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等）

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部